

ITR 缺陷对 AAV 病毒包装与感染力的影响 *

曹佐武^{1)**} 林 羿²⁾ 程龙球²⁾ 邹飞雁¹⁾

(¹⁾暨南大学生殖免疫研究所, 广州 510632, ²⁾暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632)

摘要 腺相关病毒(AAV)是一种复制缺陷性 DNA 病毒, 其基因组两端的两个倒转末端重复序列(ITR)是 rAAV 包装复制所必需的自身结构. ITR 容易缺失并影响病毒颗粒的包装和感染力. 比较两个 ITR 完整的和一端 ITR 缺失的 AAV 病毒发现, 一端 ITR 缺失的 AAV 载体质粒包装病毒的效率明显比 ITR 完整的质粒低. 用这两种 AAV 病毒感染 293 细胞、HeLa 细胞和小细胞肺癌细胞 NCI H446 细胞, 显示两个 ITR 完整的 AAV 病毒感染细胞的能力明显比一个 ITR 缺失的病毒强. 说明 ITR 缺失对 AAV 病毒的包装和感染力都有明显的影响. 因此, 筛选两个 ITR 完整的 AAV 载体质粒, 并稳定其基因组的结构, 对提高病毒生产的产量和增强病毒的感染力都有显著的价值.

关键词 腺相关病毒, 倒转末端重复序列, 病毒包装

学科分类号 R394.8, Q311.8

腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是一种复制缺陷性 DNA 病毒, 仅由 3 种包被蛋白和一条 DNA 单链构成. 它的复制需要辅助病毒如腺病毒的协助. AAV 基因组为线型的单链 DNA, 每条单链 DNA 由 4 680 个碱基构成, 包括两端 145 bp 的倒转末端重复序列(ITR) 和中间的 2 个开放性阅读框.

两端的 ITR 是 AAV 复制、包装所必需的最少的自身序列. 序列中 CG 含量达 80%以上, 其前 125 bp (1~125) 序列依次可分为 A, B, B', C', C, A' 等不同的区段(图 1b), 其中 B 与 B', C 与 C' 反向互补可形成 T 形发夹结构, 作为 AAV 的 DNA 自我复制的起点, 随后的 20 bp 形成特有的 D 序列, 且有 Rep 蛋白结合位点(RBS)和末端解链位点(trs), 此两个位点和 Rep 蛋白的结合与 AAV 定点整合至染色体 19q313 有关. AAV 的末端重复序列并不是直接的重复而是倒转重复, 形成一个自我互补的 T 型发夹结构. 两端的 ITR 之间为两个开放阅读框, 即 Rep 基因与 Cap 基因, 分别编码与 AAV 复制相关的 Rep 蛋白和病毒外壳蛋白 Cap 蛋白. 切除 Rep 和 Cap 基因序列, 可以插入其他目的基因 DNA 构成重组 AAV(rAAV)表达载体, 该类重组病毒已广泛应用于基因治疗研究.

AAV 病毒具有安全性高、免疫原性低、物理性质稳定、感染细胞谱广等优点. 因此被认为是最

有前途的基因治疗载体之一. 然而, 作为基因治疗的载体, rAAV 病毒也有一些局限性. rAAV 病毒载体制备程序复杂、包装量低. 而且, AAV 的感染能力也较弱^[1], 实际应用需要较大的剂量. 尽管多年来努力改进 rAAV 的生产, 如用腺病毒辅助质粒代替腺病毒, 调整 Cap 与 Rep 蛋白的比例^[2,3]等, 生产效率仍然很低. 优化 AAV 的制备方法, 提高生产效率和病毒活性, 具有很大的应用价值.

AAV 是复制缺陷性 DNA 病毒, 只要通过辅助病毒或质粒额外提供 Rep 和 Cap 蛋白, 凭借 AAV 基因序列中存在的两个自身 ITR 结构, 质粒中的 AAV 基因组即可释出并包装成新的病毒粒子^[4]. 而且, 与其互补的单链 DNA 也可被包装成病毒颗粒. ITR 还是形成环形 AAV 中间体的关键结构^[5], 这些中间体是 AAV 复制和包装的有效模板. 但是, AAV 基因组中的 ITR 结构并不稳定, 在复制过程中容易突变或丢失. 利用一些常规的大肠杆菌菌株克隆 AAV 基因时, 很容易出现 ITR 丢失. 由于 ITR 在 AAV 病毒复制、包装过程中的关键作用, 带缺陷 ITR 或缺失 ITR 的 AAV 病毒的包装能力则

* 国家自然科学基金资助项目(30271370 和 30672231).

** 通讯联系人.

Tel: 020-31545871, E-mail: caozuowu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-07-31, 接受日期: 2007-11-05

ATGTTGTGGCGGATCTTGAA.

用无菌纯水配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 的引物液. 再与定量 PCR 的缓冲液 (2 $\times$ AB mix, Applied Biosystems) 配成 PCR 完全缓冲液 (master mix), 其中的引物浓度分别为 200 nmol/L. 将完全缓冲液分配到 PCR 板预设的反应孔里, 每孔加 8 μl 完全缓冲液. 然后每孔分别加入 2 μl 相应的病毒消化液或标准品稀释液. 制作标准曲线的标准品为梯度稀释的 pScGFP 质粒. 质粒 DNA 的浓度分别相当于每 2 μl 含 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 条 DNA 链. 每个样品设 3 个反应孔以求平均值.

在 ABI 公司实时荧光定量 PCR 系统中扩增分析. PCR 的反应程序如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 反应 35 个循环.

1.4 2 种病毒感染细胞能力的比较

重组病毒的感染能力以其感染 293 细胞、HeLa 细胞和小细胞肺癌细胞 NCI H446 确定. 用含有 10% 胎牛血清 (HyClone) 的 DMEM 培养 3 种细胞. 在细胞密度约为 70% 时, 重新将细胞植入 24 孔板 (Costar[®]) 上, 在细胞生长到对数期时用重组病毒感染细胞. 按每孔细胞计数 (2×10^5), 感染细胞的病毒量为 1 000 MOI. 共感染 5 次, 每次用 2 种病毒分别感染 4 孔细胞. 感染 1 h 后换以新的培养液^[8], 两天后在荧光显微镜下检查表达绿色荧光蛋白的阳性细胞, 在 10 $\times$ 10 倍数下观察, 取每个孔的中心区一视野计数绿色荧光蛋白阳性的细胞数^[9], 计算每次 4 孔的平均阳性细胞数, 再比较 5 次用两种病毒感染细胞的效果. 用两组 t 测验检验差异的显著性.

2 结 果

2.1 两种不同质粒的克隆

pScGFP 质粒经 *Kpn* I 酶切后应成为约 5.9 kb 的线性 DNA. 如果两个 ITR 完好, 经 *Sma* I 酶切后, 应得到 0.95 kb, 1.25 kb, 3.7 kb 大小的 3 条 DNA. 如果上游的 ITR 丢失, 经 *Sma* I 酶切后, 应得到 1.25 kb 和 4.7 kb 的两条 DNA. 如果下游的 ITR 丢失, 经酶切后得到约为 0.95 kb 和 5.0 kb 的两条 DNA.

用 pScGFP 质粒转化 SURE 细菌后, 接种 20 个单菌落扩增制备 DNA, 分别经 *Kpn* I 和 *Sma* I 酶切后, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳发现有 2 种类型的 DNA. 两种质粒经 *Kpn* I 酶切后得到与 5.9 kb 相符的一条 DNA 带, 而经 *Sma* I 酶切后, 有 2 种不同

的电泳模式, 一种有 3 条主要的 DNA 带 (图 2a), 与 0.95 kb, 1.25 kb, 3.7 kb 大小相吻合, 是 2 个 ITR 完好的质粒, 命名为 pScGFPud. 另有一条浅带约为 5 kb, 可能是一个 ITR 酶切不完全, 或者有一个 ITR 在扩增过程中突变的结果. 第二种电泳模式有 2 条主要的带, 大小与 0.95 kb 和 5.0 kb 相符, 是下游 ITR 丢失的质粒 (图 2b), 命名为 pScGFPu.

分别培养不同的克隆扩增 2 种质粒 pScGFPu 和 pScGFPud, 用于制备 AAV 病毒.

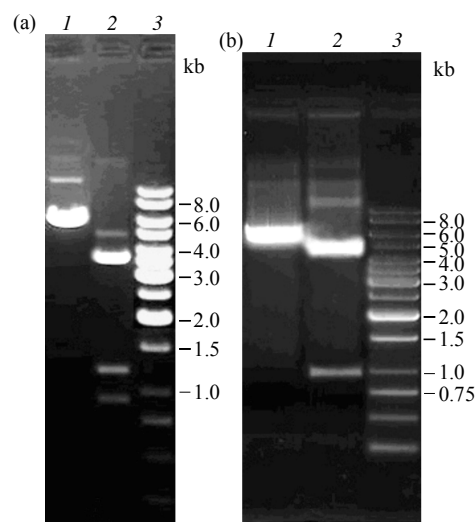


Fig. 2 Electrophoresis on 1.0% agarose gel

(a) 1: pScGFP digested by *Kpn* I; 2: pScGFP digested by *Sma* I; 3: DNA standard. (b) 1: pScGFP digested by *Kpn* I; 2: pScGFP digested by *Sma* I; 3: DNA standard.

2.2 不同 ITR 类型的载体质粒影响 AAV 病毒的包装

分别用 2 种载体质粒共转染 293 细胞, 制备 2 种重组病毒 AAV1-GFPu 和 AAV1-GFPud, 两天后在荧光显微镜下观察细胞中 GFP 的表达. 每组分别共转染 20 皿细胞. AAV1-GFPud 组培养皿的阳性细胞比 AAV1-GFPu 组的多, 细胞的荧光强度也更大 (图 3a, b).

转染 2 天后收集细胞, 制备病毒.

经两轮氯化铯梯度离心后, 依次收集离心梯度液, 1 ml/管, 共 12 管 (1~12). 通过斑点杂交确定病毒所在的位置和量. 每孔加病毒样品 5 μl 氯化铯密度梯度液. 结果见图 3c.

从斑点强度看, 用质粒 pScGFPu 制备 AAV 病毒的效率明显低于质粒 pScGFPud. 通过斑点粗略估算病毒 AAV1-GFPu 的滴度约为 4×10^{12} . 病毒

AAV1- GFPud 的滴度更高, 约为 9×10^{12} .

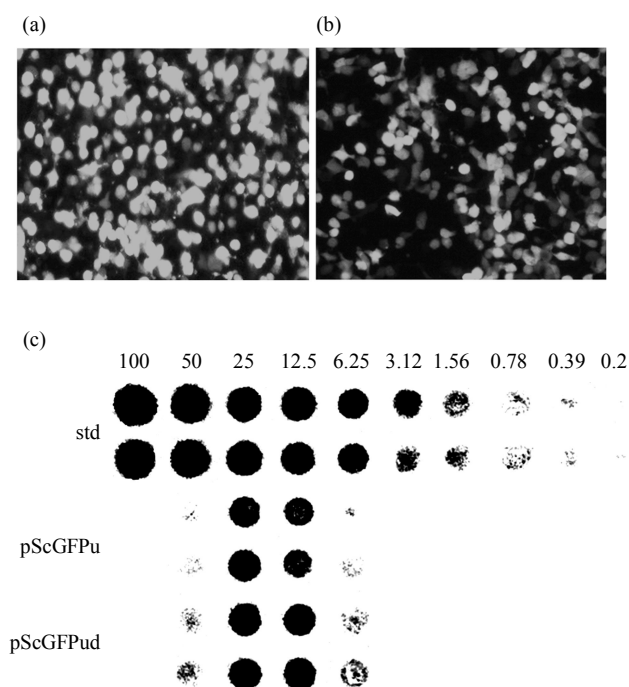


Fig. 3 AAVs packaged from plasmids with different ITR types

(a) Fluorescent microscopy of 293 cells transfected with plasmid pScGFPud. (b) Fluorescent microscopy of 293 cells transfected with plasmid pScGFPu. (c) Dot blot of AAV in the gradient CsCl fractions after 2nd round centrifugation. Top two lines: serially diluted plasmid pScGFP in duplicate, the amount of DNA per dot in order was 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12.5 ng, 6.25 ng, 3.125 ng, 1.56 ng, 0.78 ng, 0.39 ng, 0.2 ng. Middle two lines: recombinant AAV dots from plasmid pScGFPu in the gradient CsCl fractions. Bottom two lines: recombinant AAV dots from plasmid pScGFPud in the gradient CsCl fractions.

合并第 5~6 管的病毒悬液, 置于 slide-a-lyzer 透析盒(Pierce)中透析, 分离纯化后的 AAV 病毒悬于 PBS 中, 病毒 AAV1-GFPu 为 2.1 ml, 病毒 AAV1-GFPud 约 2.3 ml.

共转染后的细胞裂解液和纯化的病毒液用 PBS 稀释后, 依次用 DNase I 和蛋白酶 K 酶解. 病毒液的总稀释倍数为 2 000 倍. 取其中 2 μ l 病毒酶解液与 8 μ l 完全缓冲液(master mix)混合进行 PCR 定量分析.

用系列稀释的质粒 pScGFP 制作标准曲线, 以此计算 2 种病毒悬液的滴度和总量.

用载体质粒 pScGFPud 感染细胞后, 在细胞裂解液中测得的病毒为, 每皿细胞含 5.38×10^{11} , 7.16×10^{11} , 8.48×10^{11} , 9.40×10^{11} 病毒粒子, 平均每皿细胞含 $(7.61 \pm 1.74) \times 10^{11}$. 用载体质粒 pScGFPu 感

染细胞后, 测得的病毒数分别为每皿细胞 4.54×10^{11} , 4.20×10^{11} , 2.16×10^{11} , 2.88×10^{11} , 平均每皿细胞测得的病毒数为 $(3.45 \pm 1.12) \times 10^{11}$, 明显比质粒 pScGFPud 包装的少(图 4). 载体质粒 pScGFPud 感染 20 皿细胞获得的纯化 AAV 为 1.08×10^{13} , 而质粒 pScGFPu 共转染 20 皿细胞获得的 AAV 为 4.28×10^{12} . 另外, 最后纯化的病毒比细胞裂解液中的病毒总量少, 反映了病毒分离纯化过程中的病毒损失.

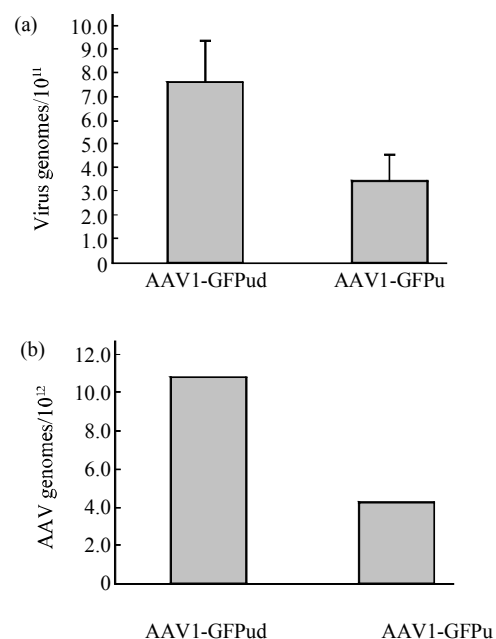


Fig. 4 AAV yields from 293 cells co-transfected with plasmids pScGFPud and pScGFPu

(a) Genomic numbers of recombinant AAV packaged in one dish. (b) Total AAV yields from 20 dishes cells.

2.3 不同病毒的感染能力

用两种不同的病毒感染 293 细胞、HeLa 细胞和小细胞肺癌细胞 NCI H446, 两天后在荧光显微镜下检查表达绿色荧光蛋白的阳性细胞, 发现用病毒 AAV1-GFPud 感染后的阳性细胞数普遍比病毒 AAV1-GFPu 感染的细胞多(图 5). 取每个培养孔的中心区一视野计数绿色荧光蛋白阳性的细胞数, 病毒感染后的阳性细胞数如图 6 所示.

AAV1-GFPud 病毒 5 次感染 293 细胞的阳性细胞平均数分别为: 39.0、34.8、27.0、31.0、39.2, 阳性细胞总平均计数为 (34.2 ± 5.27) . AAV1-GFPu 病毒 5 次感染 293 细胞的阳性细胞平均数分别为: 19.8、20.0、17.5、20.3、20.0, 阳性细胞总计数为

(19.5 ± 1.13). AAV1-GFPud 病毒 5 次感染 HeLa 细胞的阳性细胞平均数分别为: 35.8、29.8、26.8、29.5、22.5, 阳性细胞总平均计数为(28.8 ± 4.84). AAV1-GFPu 病毒 5 次感染 HeLa 细胞的阳性细胞平均数分别为: 16.0、14.5、15.2、15.0、10.8, 总平均计数为(14.3 ± 2.06). AAV1-GFPud 病毒 5 次感染 NCI H446 细胞的阳性细胞平均数分别为: 16.8、

17.0、15.5、22.5、24.5, 阳性细胞总平均计数为(19.2 ± 3.98). AAV1-GFPu 病毒 5 次感染 NCI H446 细胞的阳性细胞平均数分别为: 10.5、10.2、7.5、7.5、6.8, 总平均计数为(8.5 ± 1.74).

比较感染 3 种细胞的结果均显示, AAV1-GFPud 的感染力比 AAV1-GFPu 的感染力强 (图 6), t 检验均显示 $P < 0.001$, 差异有很显著意义.

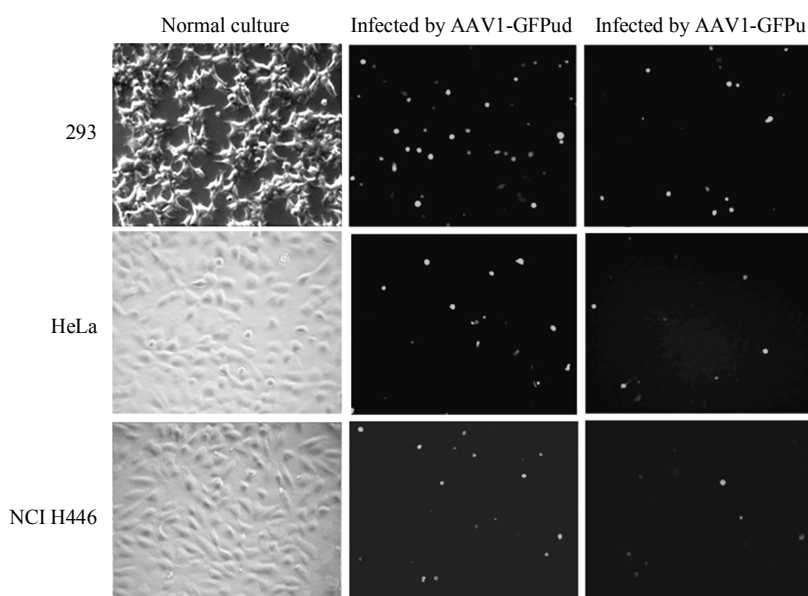


Fig. 5 Comparison of the green fluorescent protein-expressing cells in 293 HeLa and NCI H446 cells after infected by viruses AAV1-GFPud and AAV1-GFPu, respectively.

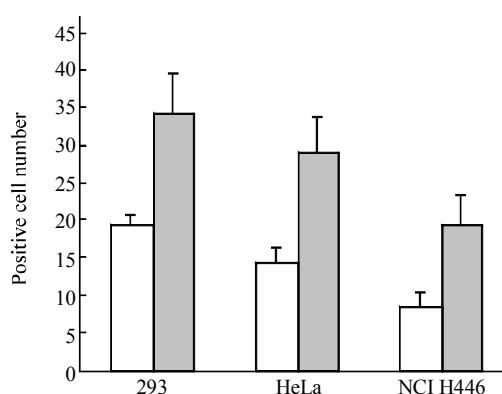


Fig. 6 GFP-expressing cells counted in a 10×10 field under fluorescent microscope

(34.2 ± 5.23) GFP-positive 293 cells were counted after infected with AAV1- GFPud, (19.5 ± 1.13) GFP-positive 293 cells were counted after infected with AAV1-GFPu ($P < 0.001$). (28.8 ± 4.84) HeLa cells were counted as GFP- positive after infected by virus AAV1-GFPud and (14.3 ± 2.06) cells were GFP-positive after infected by virus AAV1-GFPu ($P < 0.001$). (19.2 ± 3.98) NCI H446 cells were counted as GFP-positive in virus AAV1-GFPud group and (8.5 ± 1.74) cells were positive in virus AAV1-GFPu group ($P < 0.001$). □: AAV1-GFPu, ■: AAV1-GFPud.

3 讨 论

腺相关病毒是最有前途的基因治疗载体之一, 但它是复制缺陷的病毒, 需要其他辅助病毒如腺病毒的协助才能进行复制繁殖. 而且, 在目前制备重组病毒的方法中, 普遍存在病毒包装效率低和病毒感染力差的问题.

AAV 的基因组是两端带 ITR 序列的单链 DNA, 在质粒扩增中 ITR 容易丢失, 因此, 通常 AAV 载体质粒是不同 ITR 结构的质粒混合物. 而 ITR 缺失突变被认为是影响 AAV 包装和感染能力的一个重要因素. 重新克隆 AAV 载体质粒 pScGFP 后, 酶切分析发现, 质粒混合物里主要有两种 ITR 状态, 一种质粒保留两个 ITR, 另一种质粒只保留一端 ITR, 另一端 ITR 丢失. 该载体质粒主要是下游 ITR 缺失. 理论上讲, 两端的 ITR 结构相似, 突变的机会相同, 但该质粒 pScGFP 以丢失下游 ITR 为主, 可能与 AAV 基因组相邻的质粒

DNA 结构有关. 先前有研究发现, 在 AAV 复制释出实验中, 左侧的 ITR 比右侧的 ITR 更有优势^[10], 显示两端的 ITR 在功能活性方面还是有一定的差异.

SURE 细胞有利于维持 ITR 的稳定性. ITR 的缺失突变与其序列结构密切相关. 由于 ITR 序列中 CG 达 80% 以上, 其前 125 bp (1~125) 序列反向互补容易形成 T 形发夹结构, 这种特殊的结构在复制过程中容易缺失. 大肠杆菌 DNA 修复系统会针对重复序列、二级结构等 DNA 进行重排或删除修饰, 使得 AAV 载体质粒常常成为含不同 ITR 模式的混合体, 重新克隆后很快又会发生突变缺失. SURE 菌是一种基因工程改造的突变菌株, 其细胞针对大肠杆菌的一些参与修饰的基因或蛋白质进行突变, 使得真核来源、不规则 DNA 的稳定性提高 20 倍以上, 也适合克隆甲基化 DNA. 本文利用 SURE 细胞的特性克隆和扩增 AAV 载体质粒, 以便维持 AAV 基因组的结构完整, 提高 AAV 病毒的包装能力和感染能力.

本研究分别以两种不同的载体质粒, pScGFPu 和 pScGFPud, 共转染 293 细胞制备 AAV 病毒, 可以在荧光显微镜下看到明显不同的阳性细胞 (图 3a, b). 细胞裂解液经氯化铯梯度离心后, 斑点印记实验可以观察到质粒 pScGFPu 转染的细胞产生的病毒比用 pScGFPud 生产的病毒少 (图 3c). 更准确的滴度通过定量 PCR 测定, 两端 ITR 完好的 AAV 质粒 pScGFPud 转染细胞后更高效地包装病毒颗粒, 20 皿细胞产生的病毒达 1.08×10^{13} , 而质粒 pScGFPu 包装产生的病毒为 4.28×10^{12} (图 4).

AAV 病毒的产生与 AAV 基因组 DNA 重新“释出” (rescue)、病毒基因组 DNA 的复制和重新包装有关. AAV 的 ITR 成为 DNA 的复制起始点, AAV 的 ITR 折叠配对成为发夹结构, ITR 的 3' 端相当于自我复制的引物. 如果另一端的 ITR 完整, 其互补链的 3' 端也可作为引物以同样方式复制. 这样释出的速度更快, 包装的病毒粒子更多. 如果远端的 ITR 有缺陷或丢失, DNA 的复制模板只有正链, 复制速度可能减半. 而产生的 AAV 基因组也有一个完整的 ITR 和一个缺陷的 ITR. 当然, ITR 缺陷的 AAV 病毒感染力也低.

AAV 感染细胞的能力与病毒进入细胞、病毒 DNA 在细胞内释放以及病毒基因的表达等因素有关. 不同血清型的 AAV 对不同组织细胞有不同的侵袭力, AAV 对不同细胞的亲嗜性主要表现在其

衣壳蛋白和组织细胞的种类, 如 AAV1 型病毒对肌细胞有强感染力. AAV 基因在细胞中的表达与其基因组 DNA 结构以及转录密切相关. ITR 在 AAV 基因转录过程中至关重要. ITR 的二级结构与某些转录蛋白的结合参与转录^[9]. ITR 的 D 序列也是包装 AAV 粒子所必需的^[11]. 只要有一侧的 ITR, 病毒就有感染性. 如果两侧都有 ITR, 其转录速度快, 表现的感染力强. 本文用不同 ITR 结构的 AAV 感染 293 细胞, 显示一侧 ITR 丢失的 AAV 的感染力明显低于具有完整 ITR 的 AAV. 而用这两种病毒分别感染宫颈癌细胞、HeLa 细胞和小细胞肺癌细胞 NCI H446, 同样也显示具有完整 ITR 的 AAV 感染力强, AAV 基因组中的 ITR 在 AAV 侵入细胞后的对复制和表达起关键作用. 虽然 AAV1-GFP 感染小细胞肺癌细胞 NCI H446 细胞的能力较差, 但如果把 GFP 载体质粒 pScGFP 包装为其他血清型, 可以改变其对不同细胞的亲嗜性, 而在其他血清型的 AAV 病毒中, 具有完整 ITR 的 AAV 必将比一侧 ITR 丢失 AAV 的感染力更强.

本研究结果显示, ITR 是 AAV 基因的一个主要成分, ITR 完整的载体质粒能更高效地包装病毒颗粒, 两端 ITR 完好的 AAV 病毒感染细胞的效率更高. 而用 SURE 细胞可更好地维持 AAV 基因组中 ITR 的完整性.

参 考 文 献

- 1 Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1992, **158**: 97~129
- 2 Li J, Samulski R J, Xiao X. Role for highly regulated rep gene expression in adeno-associated virus vector production. *J Virol*, 1997, **71**(7): 5236~5243
- 3 Merten O W, Ge'ny-Fiamma C, Douar A M. Current issues in adeno-associated viral vector Production. *Gene Therapy*, 2005, **12** (1S): S51~S61
- 4 Samulski R J, Chang L S, Shenk T. Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol*, 1989, **63**(9): 3822~3828.
- 5 Musatov S, Roberts J, Pfaff D, Kaplitt M. A *cis*-acting element that directs circular adeno-associated virus replication and packaging. *J Virol*, 2002, **76**(24): 12792~12802
- 6 Zolotukhin S, Byrne B J, Mason E, *et al*. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Therapy*, 1999, **6**(6): 973~985
- 7 曹佐武, 李观贵, 梁郁强, 等. 8 型 AAV 重组病毒介导的凝血因子的基因表达. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(1): 80~86

- Cao Z W, Li G G, Liang Y Q, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2007, **34**(1): 80~86
- 8 Yan Z Y, Zak R, Zhang Y, *et al.* Inverted terminal repeat sequences are important for intermolecular recombination and circularization of adeno-associated virus genomes. J Virol, 2005, **79**(1): 364~379
- 9 Haberman R P, McCown T J, Samulski R J. Novel transcriptional regulatory signals in the adeno-associated virus terminal repeat A/D junction element. J Virol, 2000, **74**(18): 8732~8739
- 10 Bohenzky R A, Berns K I. Interactions between the termini of adeno-associated virus DNA. J Mol Biol, 1989, **206**(1): 91~100
- 11 Wang X S, Ponnazhagan S, Srivastava A. Rescue and replication of adeno-associated virus type 2 as well as vector DNA sequences from recombinant plasmids containing deletions in the viral inverted terminal repeats: selective encapsidation of viral genomes in progeny virions. J Virol, 1996, **70**(3): 1668~1677

Influence of Defect ITR on The Packaging and Infectivity of AAV *

CAO Zuo-Wu^{1)**}, LIN Yi²⁾, CHENG Long-Qiu²⁾, ZOU Fei-Yan¹⁾

¹⁾ Institute of Reproductive Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

²⁾ College of Life Sciences and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract The inverted terminal repeat (ITR) is the only *cis* element of AAV genome essential for rAAV rescue, replication and packaging. It is prone to mutation or loss when it is latent in host cell or in plasmid. Plasmids with different ITR types were cloned to compare the influence of ITR types on the AAV packaging and infectivity. The vector plasmids were transformed the competent SURE cells to get different colonies. The ITR types of plasmids were screened by digestion with *Sma* I. AAV vector plasmid pScGFPud has two ITRs at both ends of AAV genome and plasmid pScGFPu has only one ITR at upstream end of AAV genome. When the two plasmids were co-transfected 293 cells to prepare rAAVs, 1.08×10^{13} viral particles (AAV1-GFPud) were produced from 20-dishes of 293 cells cotransfected with plasmid pScGFPud, 4.28×10^{12} viral particles (AAV1-GFPu) were produced from 20-dishes of 293 cells cotransfected with plasmid pScGFPu. Virus AAV1-GFPud infected 293, HeLa and NCI H446 cells more efficiently than did virus AAV1-GFPu. This suggests that defect ITRs in AAV genome is deleterious to AAV packaging and AAV infectivity and vector with complete ITRs is favorable to the yield and activity of rAAV.

Key words AAV, ITR, AAV packaging

*This study was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30271370, 30672231).

**Corresponding author.

Tel: 86-20-31545871, E-mail: caozuowu@yahoo.com.cn

Received: July 31, 2007 Accepted: November 5, 2007